

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/083108 A1(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/09, C12Q
1/68, G01N 33/53, 33/566式会社内 Hyogo (JP). 高地 泰浩 (KOUCHI, Yasuhiro)
[JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通
1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/03307

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 19 日 (19.03.2003)

(74) 代理人: 庄司 隆 (SHOJI, Takashi); 〒101-0032 東京都
千代田区岩本町 3 丁目 2 番 1 0 号 SN 岩本町ビル
6 階 Tokyo (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-93443 2002 年 3 月 29 日 (29.03.2002) JP(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): シスメ
ックス株式会社 (SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒
651-0073 兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番
1 号 Hyogo (JP).(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
アラブ特許 (AE, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KE, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浅野 孝
(ASANO, Kaoru) [JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市
中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス
株式会社内 Hyogo (JP). 高畑 隆之 (TAKAHATA, Takayuki)
[JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通
1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).
沼田 成弘 (NUMADA, Shigehiro) [JP/JP]; 〒651-0073
兵庫県 神戸市中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号
シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 眞砂 明典
(MASAGO, Akinori) [JP/JP]; 〒651-0073 兵庫県 神戸
市中央区 脇浜海岸通 1 丁目 5 番 1 号 シスメックス株

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: GENE EXAMINATION METHOD FOR JUDGING THE ONSET RISK OF GLAUCOMA

(54) 発明の名称: 緑内障発症リスク判断のための遺伝子検査方法

(57) Abstract: To provide a gene examination method for predicting the onset risk of glaucoma based on the relation between a glaucoma-associated gene and the onset of glaucoma, the onset of glaucoma in future is predicted by using as an indication mutations in the gene region involving the code region and/or the upstream region of a glaucoma-associated gene. In the base sequence represented by SEQ ID NO:1, mutation(s) in at least one of the following positions are detected, i.e., the 194-, 199-, 324-, 1051-, 1084-, 1627-, 1685-, 1756-, 1853-, 2830-, 3371-, 4037- and 4364-positions.

(57) 要約: 緑内障関連遺伝子と緑内障発症の関係から、緑内障の発症リスクを事前に予知するための遺伝子の検査方法を提供するために、緑内障関連遺伝子のコード領域および/または上流領域を含む遺伝子領域における塩基の変異を指標として将来の緑内障発症を予測する。変異の位置が配列番号 1 で示される塩基配列における 194 位; 199 位; 324 位; 1051 位; 1084 位; 1627 位; 1685 位; 1756 位; 1853 位; 2830 位; 3371 位; 4037 位または 4364 位のいずれか少なくとも 1 以上の位置の変異を検出することによる。

WO 03/083108 A1

明 細 書

緑内障発症リスク判断のための遺伝子検査方法

5 技術分野

本発明は、臨床検査の分野における緑内障関連遺伝子の検査方法および該遺伝子の変異を指標として緑内障発症リスクを予測するための検査方法に関する。例えば緑内障遺伝子として知られているミオシリン（以下「MYOC」という。）遺伝子の異常を検出し、該検出された異常、すなわち遺伝子の特定位置における塩基の変異を指標として緑内障を診断する遺伝子の検査方法、特に個体について将来発症する可能性を予知するための検査方法に関する。

背景技術

15 緑内障は、目の中にある房水が排出されない状態となり、目圧が上がって目の機能が落ちる疾患である。放置しておくと、見える範囲が狭まったり、視力が落ちたりして失明する。ただし、眼圧が正常にも関わらず、視神経に障害をきたす場合がある。

緑内障は、原発性開放隅角緑内障（POAG）、正常眼圧緑内障（NTG）、
20 原発性閉鎖隅角緑内障（PACG）、先天性緑内障および続発性緑内障の5つの病態に分類され、緑内障の20%が遺伝性のものと言われている。これらのうち、最も多いのがPOAGである。1988年から1989年にかけて社団法人日本眼科医会が実施した全国疫学調査によると、40歳以上の人口のうち3.56%が緑内障患者であると報告されている。

25 緑内障の主な危険因子は家族歴であり、その発症には遺伝子が関与していることが強く示唆される。1996年5月17日に出願された Nguyen

- らの米国特許第 5,789,169 号において、緑内障関連遺伝子として T I G R (小柱網誘導グルコシルチコイド応答) タンパク質をコードする遺伝子が開示された。T I G R 遺伝子は、別名 M Y O C 遺伝子としても知られている。Nguyen らの米国特許第 5,789,169 号はまた、そのタンパク
- 5 質の c D N A 配列、タンパク質自身、それに結合する分子、および結合分子をコードする核酸分子を開示しており、また緑内障および関連疾患の診断、ならびに心血管疾患、免疫疾患または該タンパク質の発現や活性に影響する他の疾患や状態といった他の疾患または状態の診断のための改善された方法および試薬を提供した。また、緑内障関連遺伝子のう
- 10 ち C Y P 1 B 1 遺伝子における突然変異を検出し、該突然変異の存在を緑内障の指標として個体における緑内障の診断を行う方法も開示されている (特表 2001-512969 号公表公報)。しかしながら、これらは緑内障関連遺伝子と緑内障の関係に着目しているものの、将来における緑内障の発症リスクを効果的に予知する手段を開示するものではない。
- 15 一方、WO 01/88120 A1 国際公開公報では、該公報の配列表に示す M Y O C 遺伝子のプロモーター領域である -153 位の遺伝子の変異を検出する方法が開示され、遺伝性が心配される家系や未発症キャリアーであることが心配される患者においては、緑内障のスクリーニングとして使用することができることが示されている。しかしながら、ここでは -153
- 20 位の 1 箇所の変異に着目し、これを指標としているのみである。

緑内障は潜行性であるため、視神経に対し重大な損傷が起こる前に予防また軽減する方法をとることができるように、緑内障が発生する可能性を早期に診断または効果的に予測する一層優れた方法が要望されている。

(発明が解決しようとする課題)

- 遺伝的に緑内障の危険因子を保有し、将来における発症リスクが高い個体を特定し、その個体に関して重点的に緑内障の検査を実施することができれば、効率的に緑内障の早期発見、早期治療をなしうると考えられる。係る状況に鑑みて、本発明は緑内障関連遺伝子と緑内障発症の関係から、緑内障の発症リスクを効果的に予知するための遺伝子の検査方法を提供する事を課題とする。

(課題を解決するための手段)

- 10 本発明者らは、緑内障の発症が遺伝子の変異に関与することに着目し、緑内障患者および非患者の緑内障原因遺伝子の上流領域およびコード領域の遺伝子配列の分析を行い、鋭意研究を重ねた結果、該遺伝子に患者群と非患者群で頻度に差が観察される遺伝的多型が存在することを見出した。さらに、この遺伝的多型の有無により緑内障の有病率が一般集団
- 15 の有病率と比較した場合に統計的に有意に変化することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、

1. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域における少なくとも2箇所以上の塩基の変異を検出し、該変異を
- 20 指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法、
2. 緑内障関連遺伝子がミオシリン(MYOC)遺伝子である前項1に記載の検査方法、
3. 連遺伝子領域が配列番号1で示される塩基配列である前項1または
- 25 2に記載の検査方法、
4. 塩基の変異が、置換、欠失および／または挿入である前項1～3の

いずれか 1 に記載の検査方法。

5. 配列番号 1 で示される塩基配列における 1 9 4 位の C から A への置換 ; 1 9 9 位の A から C への置換 ; 3 2 4 位の G から A への置換 ; 1 0 5 1 位の C から T への置換 ; 1 0 8 4 位の C から T への置換 ; 1 6 2 7 位の T から C への置換 ; 1 6 8 5 位の T から C への置換 ; 1 7 5 6 位の C から T への置換 ; 1 8 5 3 位の G から C への置換 ; 2 8 3 0 位の G から A への置換 ; 3 3 7 1 位の A から G への置換 ; 4 0 3 7 位の G から A への置換 ; 4 3 4 6 位の G から A への置換からなる群のいずれかを検出する前項 3 に記載の検査方法、
- 10 6. 配列番号 1 で示される塩基配列における 1 9 4 位の C から A への置換 ; 1 0 8 4 位の C から T への置換 ; 1 6 2 7 位の T から C への置換 ; 4 0 3 7 位の G から A への置換 ; 4 3 4 6 位の G から A への置換からなる群の少なくとも 2 以上の同時置換を検出する前項 3 に記載の検査方法、
- 15 7. 配列番号 1 で示される塩基配列における 1 0 5 1 位の C から T への置換 ; 1 6 8 5 位の T から C への置換 ; 1 7 5 6 位の C から T への置換 ; 1 8 5 3 位の G から C への置換からなる群の少なくとも 2 以上の同時置換を検出する前項 3 に記載の検査方法、
- 20 8. 配列番号 1 で示される塩基配列における 1 9 9 位の A から C への置換 ; 3 2 4 位の G から A への置換 ; 1 0 5 1 位の C から T への置換 ; 1 0 8 4 位の C から T への置換 ; 1 6 2 7 位の T から C への置換 ; 1 6 8 5 位の T から C への置換 ; 1 7 5 6 位の C から T への置換 ; 1 8 5 3 位の G から C への置換 ; 2 8 3 0 位の G から A への置換 ; 3 3 7 1 位の A から G への置換からなる群の少なくとも 1 の置換を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査
- 25 方法、
9. 緑内障が原発性開放隅角緑内障および／または正常眼圧緑内障であ

る前項 1 ～ 8 のいずれか 1 に記載の検査方法、

10. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドを用いて変異を検出することを特徴とする前項 1 ～ 9 のいずれか 1 に

5 記載の検査方法、

11. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドが、以下に表される配列からなるオリゴヌクレオチドの群より少なくとも 1 以上選択され、プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド；

10 1) 配列番号 2 から 27 のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド。

2) 前記 1) に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖。

3) 前記 1) または 2) に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド。

15 4) 前記 1) ～ 3) のいずれか 1 に記載のオリゴヌクレオチドと約 60% の相同性を有するオリゴヌクレオチド。

5) 前記 1) ～ 4) に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1 ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含むオリゴヌクレオチド、

20 12. 前項 11 に記載のオリゴヌクレオチドから選択される少なくとも 1 のオリゴヌクレオチドを用いて核酸増幅処理方法を行うことを含む前項 1 ～ 9 のいずれか 1 に記載の検査方法、

13. 前項 1 ～ 10 または 12 のいずれか 1 に記載の検査方法に使用する試薬を含んでなる検査用試薬または検査用試薬キット、からなる。

第1図は、MYOC遺伝子の構造およびプライマーの位置関係を示す図である。(実施例1)

第2図は、ベイズの定理の説明を示す図である。(実施例2)

5 発明を実施するための最良の形態

発明者らは、緑内障患者および非患者において、配列番号1に示される塩基配列からなる緑内障原因遺伝子の翻訳開始点から4120塩基にわたる上流領域および翻訳開始点以降のコード領域の遺伝子配列の決定を行った。その過程において、該遺伝子上流領域およびコード領域に患者群と非患者群で頻度に差が観察される遺伝的多型が存在することを確認した。さらに、この遺伝的多型の有無の検討によって、緑内障の有病率が一般集団の有病率と比較した場合に統計的に有意に変化する事実を証明した。本発明は、上記新知見に基づいて構成される。

15 (緑内障関連遺伝子)

本発明における、緑内障関連遺伝子の例としてTIGR(小柱網誘導グルココルチコイド応答)遺伝子が挙げられる。このTIGR遺伝子は、別名MYOC遺伝子としても知られている。MYOC遺伝子上流およびコード領域の構造および配列は、第1図および配列番号1に表されているとおりであって、例えばプロモーター要素を有する上流領域およびタンパク質をコードするコード領域ならびに他の要素がある。該MYOC遺伝子の塩基の位置は、配列番号1において定めた塩基番号に従う(Genbank 受入番号 NT_029874)。このMYOCタンパク質をコードする領域は、三個のエキソンから構成される。配列番号1の1~4120位は上流領域であり、4120~4722位はエキソン1を表す。

(遺伝子の変異)

本発明の緑内障関連遺伝子の変異とは、MYOC遺伝子の塩基配列中の特定位置の塩基の、異なる塩基への置換、欠失および／または挿入があることをいう。該特定位置は、たとえば、異なる塩基に置換されること
5 とをいう。該特定位置は、配列番号1に示される塩基配列の194位、199位、324位、1051位、1084位、1627位、1685位、1756位、1853位、2830位、3371位、4037位および／または4346位から選択される位置をいう。

本発明における特定位置での具体的な塩基の置換は、配列番号1で示
10 される塩基配列の194位のCからAへ；199位のAからCへ；324位のGからAへ；1051位のCからTへ；1084位のCからTへ；1627位のTからCへ；1685位のTからCへ；1756位のCからTへ；1853位のGからCへ；2830位のGからAへ；3371位のAからGへ；4037位のGからAへ；4346位のGからAへ
15 置換が挙げられる。

好ましくは、配列番号1で示される塩基配列の199位；324位；1051位；1084位；1627位；1685位；1756位；1853位；2830位の；3371位の塩基について少なくとも1の置換を検出し、遺伝子の検査を行う。さらに、194位；199位；324
20 位；1051位；1084位；1627位；1685位；1756位；1853位；2830位；3371位；4037位；4346位の塩基から少なくとも2以上の置換を検出することがより好ましい。

(検査方法)

25 当該遺伝子の変異の検査方法は、本発明によって開示するMYOC遺伝子の特定の変異を検出する限りにおいて、その手法は何ら限定され

るものではなく、公知もしくは将来得られうる各種の方法を広く用いることができる。

- 被験者のMYOC遺伝子について本発明で開示される変異を検査するために、当該変異位置を含む塩基配列を解析する各種の方法を用いることができる。これらの方法としては、例えばサザンハイブリダイゼーション法、ドットハイブリダイゼーション法(J. Mol. Biol., 98: 503-517 (1975)等参照)、ジデオキシ塩基配列決定法(サンガー法)、DNAの増幅手法を組合せた各種の検出法[例えばPCR-制限酵素断片長多型分析法(RFLP: Restriction fragment length polymorphism)、PCR-単鎖高次構造多型分析法(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 86: 2766-2770 (1989)等参照)、PCR-特異的配列オリゴヌクレオチド法(SSO: Specific sequence oligonucleotide)、PCR-SSOとドットハイブリダイゼーション法を用いる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド法(Nature, 324: 163-166 (1986)等参照)]等を用いることができる。本発明によって検出すべき遺伝子変異の位置が開示され特定されている以上、当業者にとっては公知の方法を用いてその変異を検出することができる。

(検査用試料の調製)

- 被験者のMYOC遺伝子を解析するために、本発明の検査方法に供される検査用試料は、被験者のMYOC遺伝子を含む生物学的試料であれば良く、特に限定されない。このような生物学的試料としては、生体材料組織、手術切除組織、口腔粘膜組織等の生体から採取した組織の他、血液、血清、糞便、射出精液、喀痰、唾液、脳脊髄液、毛髪等が挙げられる。例えばブレンダーを用いて組織等の生物学的試料を破碎し、フェノール・クロロホルム法などの公知の遺伝子抽出方法で抽出したMYO

C遺伝子を被検用試料とすることができる。さらに抽出したMYOC遺伝子を増幅し、濃縮したものを被検用試料とすることができる。

ここで、被検用試料は、MYOC遺伝子の全長DNAでもよく、DNA断片（部分DNA）であってもよい。DNA断片が検査に供される場合には、MYOC遺伝子の上流領域および／またはコード領域を含み、
5 少なくとも1箇所以上、好ましくは2箇所以上、より好ましくは3箇所以上の変異にかかる特定位置を含むことが必要である。当該DNA断片は、本発明の遺伝子変異の検出に利用できるもの、即ち、塩基置換の測定のために供される被験DNAとしての測定可能な塩基長を有するものであれば、特にその塩基長について制限はない。そのようなDNAの塩基長として、通常10塩基長程度以上、好ましくは20塩基長程度以上のものを選択することができる。一般的には100～1000程度の、好ましくは200～3000程度の塩基長からなるものが選択される。

また、被検用試料は、DNA、DNA転写産物のいずれであってもよい。具体的には、DNAより転写されたメッセンジャーRNA（mRNA）でもよいし、さらにそのmRNAから逆転写されたcDNA、あるいは相補DNAであってもよい。本発明の遺伝子変異の検出法において採用され得る各種の操作、例えば、DNAまたはDNA断片の合成、DNAの切断、削除、付加または結合を目的とする酵素処理、DNAの単
15 離、精製、複製、選択、DNA断片の増幅などはいずれも常法に従うことができる（分子遺伝学実験法、共立出版（株）1983年発行等参照）。またこれらは必要に応じて、適宜常法に従い修飾して用いることもできる。

被検用試料を調製するための核酸の増幅は、例えばPCR法またはその変法に従って実施することができる（PCRテクノロジー、宝酒造（株）
25 1990年発行等参照）。この場合、緑内障関連遺伝子の一部に特異的にハ

イブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチド、具体的には変異にかかる上記特定位置を少なくとも1以上有する所望のDNA断片を特異的に増幅するように適宜選択したプライマー機能を有するオリゴヌクレオチドを利用することができる。

5

(プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド)

- プライマー機能を有するオリゴヌクレオチドとして、例えば1) 配列番号2～27のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、2) 前記1)に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖、3) 前記1) または2)に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド、4) 前記1)～3)のいずれか1)に記載のオリゴヌクレオチドと約60%の相同性を有するオリゴヌクレオチド、5) 前記1)～4)に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含むオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

- オリゴヌクレオチドは、自体公知の方法により設計することができ、例えば化学的に合成することができる。あるいは、天然の核酸を制限酵素などによって切断し、上記のような塩基配列で構成されるように改変し、あるいは連結することも可能である。具体的には、オリゴヌクレオチド合成装置(アプライドバイオシステムズ社製 Expedite Model 8909 DNA合成機)等を用いて合成することができる。また、1ないし数個の塩基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異させたオリゴヌクレオチドの合成法も、自体公知の製法を使用することができる。例えば、部位特異的変異導入法、遺伝子相同組換え法、プライマー伸長法またはポリメラーゼ連鎖増幅法(PCR)を単独または適宜組み合わせ、例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、2版、Sambrook

ら編、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク、1989年；[ラボマニュアル遺伝子工学]、村松正實編、丸善株式会社、1988年；[PCRテクノロジー、DNA増幅の原理と応用]、Ehrlich, H.E. 編、ストックトンプレス、

- 5 1989年等に記載の方法に準じて、あるいはそれらの方法を改変して実施することができ、例えばU l m e r の技術 (Science(1983)219:666) を利用することができる。

- ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は一般に知られたものを選択することができ、その一例としては、50%ホルムアミド、5×S
10 S C (150mM NaCl、15mM クエン酸三ナトリウム)、50mM リン酸ナトリウム、pH7.6、5×デンハーツ溶液、10%デキストラン硫酸、および20μg / m l のDNAを含む溶液中、42℃で一晩ハイブリダイゼーションした後、室温で2×SSC・0.1% SDS 中で一次洗浄し、次いで、約60℃において0.1×SSC・0.1% SDS で二次洗浄といった条件があげられる。

15

(DNAの変異の検出)

DNAの変異は、例えば、被検用試料に含まれるMYOC遺伝子の塩基配列をサンガー法により決定し、検出することができる。

- 1本鎖の目的MYOC遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチドをハイブ
20 リダイズさせ、これをプライマーとして5'から3'方向に相補鎖をDNAポリメラーゼによって合成させる。このときに使用するオリゴヌクレオチドは、例えば上記（プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド）で説明したオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用することができる。

- 25 反応の基質として4種のデオキシヌクレオチド三リン酸 (d N T P) のほかに少量のジデオキシヌクレオチド三リン酸 (d d N T P) を塩基

ごとに別々に加え、相補鎖を合成させる。ddNTPはデオキシリボースの3'位の-OH基が-H基になっているdNTPのアナログ（類似物質）で、dNTPの代わりにddNTPが取り込まれると、それ以上相補鎖が合成されなくなり、様々な長さのDNAが合成される。反応系に、

- 5 例えば化学発光物質や放射性同位元素（RI）で標識したプライマーやdNTPを加えることにより、合成されるDNAを標識し、反応物を変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動することにより塩基配列を決定することができる。

- 10 サンガー法に用いるDNAポリメラーゼとして、例えばクレノー（Klenow）酵素、T7ファージや好熱性細菌由来のDNAポリメラーゼなどが挙げられる。これらは共通してエキソヌクレアーゼ活性を遺伝子工学的に除いてある。当初、サンガー法では目的の塩基を1本鎖DNAにして用いていたが、現在では2本鎖プラスミドやDNAを塩アルカリで変性させて用いる方法も多用されている。

- 15 シークエンス反応はサンガー法またはサイクルシークエンス法により行うことができる。サイクルシークエンス法はサンガー法とPCRを組み合わせた方法で、鋳型DNAを1本鎖にする必要はなく、反応系にDNAとプライマー1種類、dNTPs、ddNTPs、そして耐熱性のDNAポリメラーゼを加えて行う。PCR反応中にddNTPsが取り
20 込まれ、伸長が止まり、結果として3'末端が同一の塩基のDNAが合成される点はサンガー法と同じである。自動シークエンサーのシークエンス反応には、プライマーを蛍光標識したDye primer法と、ddNTPを蛍光標識したDye terminator法、さらに基質のdNTPに標識したInternal-label法等がある。

本発明はまた、緑内障の遺伝子検査方法に使用する検査試薬および検査試薬キットも含むものである。検査試薬としては、例えば被検試料増幅用プライマー、被検用試料の塩基配列決定用プライマー、各種ポリメラーゼ、塩基基質、標識物質など本発明の方法に使用されるあらゆる試薬のいずれであっても良い。また、検査用試薬キットは本発明の方法に使用されるあらゆる試薬のうち少なくとも2以上をキットとして使用するものであれば良い。

(実施例)

10 以下、本発明の内容を実施例を用いて具体的に説明する。但し、本発明はこれらに何ら限定されるものではない。

(実施例1 MYOC遺伝子のDNA解析)

(1) DNAの抽出

15 被験者から提供を受けた血液を常法に従って処理し、有核細胞よりDNAを抽出した。DNA抽出キットとして製品名「Gen とるくん™ (血液用)」(宝酒造社製)を用い、同製品規定のプロトコールに従ってDNAを抽出した。

(2) 鋳型DNAの増幅

20 得られたDNA抽出液を鋳型とし、PCR増幅用キット、製品名「LATaq (アプライドバイオシステムズ社製)」を用いてPCRにより、MYOC遺伝子の増幅を行った。増幅用プライマーはM-F1 (配列番号: 2) をセンスプライマー、M-R3 (配列番号: 3) をアンチセンスプライマーとして使用した。M-F1は配列番号1に表された塩基配列に基づく22-46位の領域に表された塩基配列、M-R3は5992-5968位の領域に表された塩基配列の相補的な配列からなる。反応は、9

4℃ 1 分の加熱の後、94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、72℃ 5 分 30 秒のサイクルを 30 回実施した。MYOC 遺伝子のエキソン、翻訳開始点および上流領域の構造と、プライマーによって増幅される領域の位置関係は第 1 図のとおりである。

5 (3) DNA 断片の配列決定

上記 PCR により得られた DNA 断片について、自動 DNA シーケンサー ABI Prism3100 (アプライドバイオシステムズ社製) を用い、同製品規定のプロトコールに従って DNA の塩基配列を決定した。このとき、次に示すプライマーを用いてサイクルシーケンス反応を行った。

- 10 配列番号 1 に表された塩基配列に基づく領域に含まれる塩基配列またはその相補的な配列からなる次の各配列番号に表されたオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用した。

	領域 22-46 位	(配列番号: 2)、
	M-SF 1	領域 372-390 位 (配列番号: 4)、
15	M-SF 2	領域 740-759 位 (配列番号: 5)、
	M-SF 3	領域 1093-1110 位 (配列番号: 6)、
	M-SF 4	領域 1456-1475 位 (配列番号: 7)、
	M-SF 5	領域 1800-1817 位 (配列番号: 8)、
	M-SF 6	領域 2148-2165 位 (配列番号: 9)、
20	M-SF 7	領域 2498-2516 位 (配列番号: 10)、
	M-SF 8	領域 2857-2875 位 (配列番号: 11)、
	M-SF 9	領域 3227-3246 位 (配列番号: 12)、
	M-SF 10	領域 3601-3620 位 (配列番号: 13)、
	M-SF 11	領域 3910-3927 位 (配列番号: 14)、
25	逆鎖: M-SR 4	領域 4730-4712 位 相補配列 (配列番号: 15)、
	M-SR 5	領域 4337-4319 位 相補配列 (配列番号: 16)、

	M-S R 6	領域 4022-4003 位	相補配列 (配列番号: 1 7)、
	M-S R 7	領域 3712-3695 位	相補配列 (配列番号: 1 8)、
	M-S R 8	領域 3379-3360 位	相補配列 (配列番号: 1 9)、
	M-S R 9	領域 2950-2933 位	相補配列 (配列番号: 2 0)、
5	M-S R 1 0	領域 2593-2575 位	相補配列 (配列番号: 2 1)、
	M-S R 1 1	領域 2259-2241 位	相補配列 (配列番号: 2 2)、
	M-S R 1 2	領域 1950-1933 位	相補配列 (配列番号: 2 3)、
	M-S R 1 3	領域 1556-1538 位	相補配列 (配列番号: 2 4)、
	M-S R 1 4	領域 1170-1153 位	相補配列 (配列番号: 2 5)、
10	M-S R 1 5	領域 824-807 位	相補配列 (配列番号: 2 6)、
	M-S R 1 6	領域 470-453 位	相補配列 (配列番号: 2 7)

上記プライマーのうち、M-F 1 から M-S F 1 1 までは順鎖、M-S R 4 から M-S R 1 6 までは逆鎖の配列を決定するために用いる。

(4) DNA断片の連結およびMYOC遺伝子の塩基配列

15 さらに、各血液提供者毎のDNA断片の配列を、Phred/Phrap ソフトウェア (米国ワシントン大学製) を用いて連結し、各血液サンプル提供者毎に1個の塩基配列を得た。

対照となる非患者ボランティア群67名から得られた血液を上記手法に従って処理し、非患者群で多数を占めるMYOC遺伝子の塩基配列 (配
20 列番号: 1) を決定した。

(実施例2)

(1) MYOC遺伝子の塩基配列の多型の解析1

医療機関によって開放隅角緑内障と診断された患者88名から得られ
25 た血液を上記実施例の手法に従って処理し、各提供者についてのMYOC
遺伝子の塩基配列を調べ、非患者群の塩基配列と比較した。

- その結果を表 1 に示す。表 1 の第 1 行は、配列番号 1 で表される MYOC 遺伝子の塩基配列の位置、第 2 行は各位置における非患者群で多数を占める塩基、第 3 行は非患者群における各塩基位置での変異の頻度、第 4 行は患者群における各塩基位置での変異の頻度、第 5 行が変異として検出された塩基の変化を示す。

その結果、塩基位置 3 2 4 位、4 0 3 7 位および 4 3 4 6 位において、非患者群で約 3% の頻度で変異を認め、患者群では 6.8~10.2% の頻度で変異を認めた。その他の位置では、非患者群では全く変異を認めなかったのに対し、患者群では約 1~3.4% の頻度で変異を認めた。

10 (表 1)

塩基位置	194	199	324	1051	1084	1627	1685	1756	1853	2830	3371	4037	4346
塩基	C	A	G	C	C	T	T	C	G	G	G	G	G
非患者群	0.0%	0.0%	3.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	3.0%	3.0%
患者群	3.4%	1.1%	6.8%	2.3%	3.4%	3.4%	2.3%	2.3%	2.3%	2.3%	2.3%	10.2%	10.2%
変異	C→A	A→C	G→A	C→T	C→T	T→C	T→C	C→T	G→C	G→C	G→C	G→A	G→A

(2) MYOC 遺伝子の塩基配列の多型の解析 2

さらに、塩基位置 4 0 3 7 位および 4 3 4 6 位に変異を有していた患者 1 1 名および非患者 2 名について、他の位置での変異を調べた。

- 15 その結果を表 2 に示す。表 2 の第 1 行は塩基位置、第 2 行以下は各被験者での変異の有無を示す。

- その結果、非患者群では塩基位置 4 0 3 7 位および 4 3 4 6 位の他の位置では変異を認めなかったのに対し、患者群では 1 9 4 位、1 0 8 4 位および 1 6 2 7 位に変異を認める群、1 0 5 1 位、1 6 8 5 位、1 7 5 6 位および 1 8 5 3 位に変異を認める群および変異を認めない群が確認された。

(表 2)

塩基位置	194	199	324	1051	1084	1627	1685	1756	1853	2830	3371	4037	4346
患者1	*				*	*						*	*
患者2	*				*	*						*	*
患者3	*				*	*						*	*
患者4												*	*
患者5												*	*
患者6												*	*
患者7												*	*
患者8												*	*
患者9												*	*
患者10				*			*	*	*				
患者11				*			*	*	*				
非患者1												*	*
非患者2												*	*

(3) リスク判定

ベイズの定理にしたがって、MYOC遺伝子の配列に変異を有する場合の緑内障発症のリスクを予測する。

- 5 ある被験者が緑内障を将来発症する確率は、事前に何の情報も無い場合には、疫学的に得られた一般集団における有病率で判断される。この有病率を $P(G)$ とし、緑内障を発症しない確率を $P(N)$ とすると、 $P(N) = 1 - P(G)$ と表される。

一方、MYOC遺伝子の配列に単一もしくは複数の変異を有する場合

- 10 を M とし、 M を保有する被験者が緑内障を将来発症する確率を条件付確率 $P(G|M)$ とする。ここで、もし $P(G|M) > P(G)$ であるならば、その変異 M を保有している被験者は将来緑内障を発症する確率が一般集団よりも高いことになり、高リスク者と判定される。

条件付確率 $P(G|M)$ は、以下のように算出される。

- 15 緑内障患者群において M を保有する確率を $P(M|G)$ 、非患者において M を保有する確率を $P(M|N)$ とする。ベイズの定理 (第2図) より、 $P(M|N)$ は式1で示される。 $P(G)$ 値には、1988年から1989年にかけて社団法人日本眼科医会が実施した全国疫学調査によると、40歳以上の人口のうち 3.56% が緑内障患者であると報告されている数値
- 20 を引用することができる。さらに、緑内障患者および非患者の各位置におけるMYOC遺伝子の塩基の変異の確率を、各々式1、 $P(M|G)$

値、 $P(M|N)$ 値にあてはめることができる。

(式1)

$$P(G|M) = \frac{P(G) \times P(M|G)}{P(G) \times P(M|G) + P(N) \times P(M|N)}$$

以上の数式を用いて各変異について $P(G|M)$ を算出したところ、

5 1 9 4 位=28.1、1 9 9 位=28.1、3 2 4 位=2.184、1 0 5 1 位=28.1、
1 0 8 4 位=28.1、1 6 2 7 位=28.1、1 6 8 5 位=28.1、1 7 5 6 位
=28.1、1 8 5 3 位=28.1、2 8 3 0 位=28.1、3 3 7 1 位=28.1、4
0 3 7 位=3.2、4 3 4 6 位=3.2 の割合で、 $P(G)$ よりも $P(G|M)$
の数値が算出され、これらの位置で変異を有することが緑内障の高
10 リスクを示すことが判明した。このことより、上記遺伝子
の位置における変異を検出することが、開放隅角緑内障の発症リスクの
予知に有効であることが確認された。

(4) リスク判定のために有効な検査

さらに、リスク判定を有効に行うためのMYOC遺伝子の変異の位置
15 について解析し、その結果を表2に示した。

4 0 3 7 位または、4 3 4 6 位に変異を有する患者の確率は約10%
であるから、当該位置に変異を有する者の緑内障発症のリスクがまず判
断できる。また、この位置に変異を有する患者はいずれもその双方に変
異を有している。したがって、4 0 3 7 位または4 3 4 6 位のいずれか
20 一方の変異を検出し、指標とすることにより緑内障発症リスク判定する
ことができる。

しかし、非患者群でも4 0 3 7 位、4 3 4 6 位に変異を有する患者の
確率は各々約3%である。一方、4 0 3 7 位、4 3 4 6 位に変異を有す

る者のうち、194位、1084位および1627位の全てに変異を有する者は全て患者（患者1、患者2、患者3）であった。したがって、4037位または4346位のいずれか一方の変異に加えて、さらに194位、1084位および1627位のいずれか少なくとも1箇所の変異を検出し指標とすることで、偽陽性の判定を回避し緑内障発症の予測を行うことができる。

また、同様に1084位、1685位、1756位、1853位の全てに変異を有する者も全て患者（患者10、患者11）であった。したがって、1084位、1685位、1756位および1853位のいずれか少なくとも1箇所の変異を検出し指標とすることで、偽陽性の判定を回避し緑内障発症の予測を行うことができる。

産業上の利用の可能性

以上説明したように、本発明にかかる遺伝子の変異に関する情報は、緑内障の将来における発症予測に有効である。本発明の遺伝子検査方法によりMYOC遺伝子の変異を検出することで、特に開放隅角緑内障の発症を予測することができれば、発症前の段階で発症予防または早期に治療することが可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域における少なくとも2箇所以上の塩基の変異を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法。

2. 緑内障関連遺伝子がミオシリン (MYOC) 遺伝子である請求の範囲第1項に記載の検査方法。

10

3. 遺伝子領域が配列番号1で示される塩基配列である請求の範囲第1項または第2項に記載の検査方法。

4. 塩基の変異が、置換、欠失および／または挿入である請求の範囲第1項～第3項のいずれか1に記載の検査方法。

15

5. 配列番号1で示される塩基配列における194位のCからAへの置換；199位のAからCへの置換；324位のGからAへの置換；1051位のCからTへの置換；1084位のCからTへの置換；1627位のTからCへの置換；1685位のTからCへの置換；1756位のCからTへの置換；1853位のGからCへの置換；2830位のGからAへの置換；3371位のAからGへの置換；4037位のGからAへの置換；4346位のGからAへの置換からなる群のいずれかを検出する請求の範囲第3項に記載の検査方法。

25

6. 配列番号1で示される塩基配列における194位のCからAへの

置換；1 0 8 4 位の C から T への置換；1 6 2 7 位の T から C への置換；
4 0 3 7 位の G から A への置換；4 3 4 6 位の G から A への置換からなる群の少なくとも 2 以上の同時置換を検出する請求の範囲第 3 項に記載の検査方法。

5

7. 配列番号 1 で示される塩基配列における 1 0 5 1 位の C から T への置換；1 6 8 5 位の T から C への置換；1 7 5 6 位の C から T への置換；1 8 5 3 位の G から C への置換からなる群の少なくとも 2 以上の同時置換を検出する請求の範囲第 3 項に記載の検査方法。

10

8. 配列番号 1 で示される塩基配列における 1 9 9 位の A から C への置換；3 2 4 位の G から A への置換；1 0 5 1 位の C から T への置換；1 0 8 4 位の C から T への置換；1 6 2 7 位の T から C への置換；1 6 8 5 位の T から C への置換；1 7 5 6 位の C から T への置換；1 8 5 3 位の G から C への置換；2 8 3 0 位の G から A への置換；3 3 7 1 位の A から G への置換からなる群の少なくとも 1 の置換を検出し、該変異を指標として将来の緑内障の発症を予測することを特徴とする遺伝子の検査方法。

20 9. 緑内障が原発性開放隅角緑内障および／または正常眼圧緑内障である請求の範囲第 1 項～第 8 項のいずれか 1 に記載の検査方法。

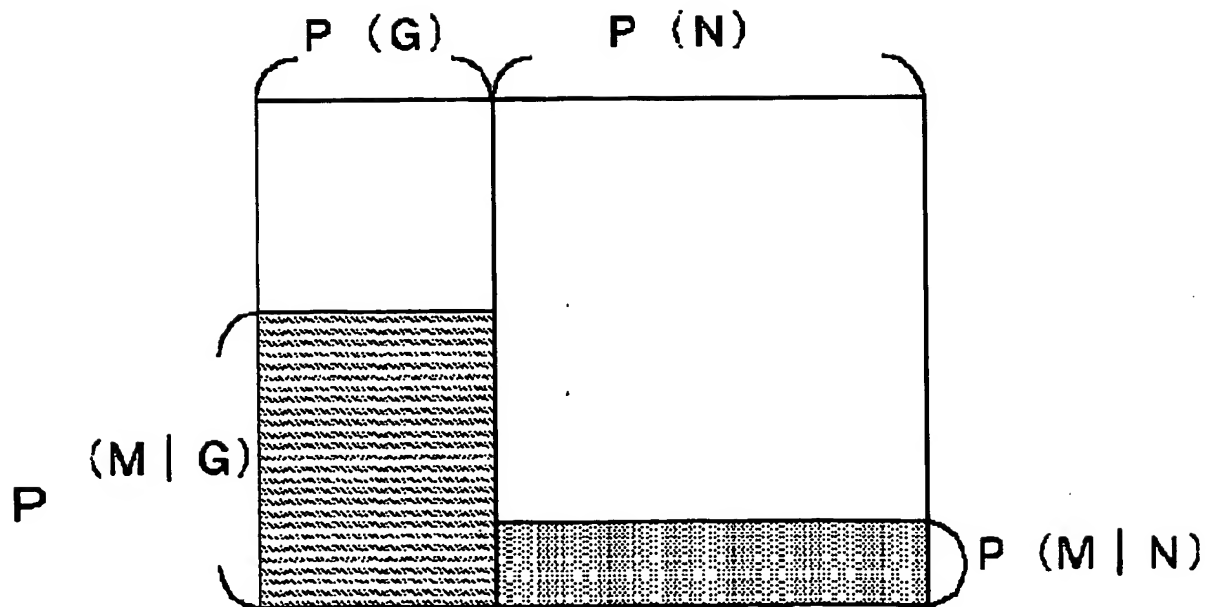
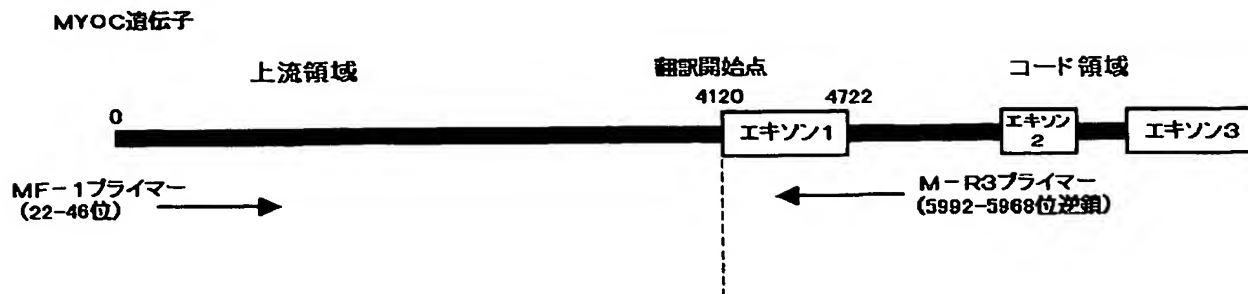
25 10. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオチドを用いて変異を検出することを特徴とする請求の範囲第 1 項～第 9 項のいずれか 1 に記載の検査方法。

- 1 1. 緑内障関連遺伝子のコード領域および／または上流領域を含む
遺伝子領域の一部に特異的にハイブリッドを形成しうるオリゴヌクレオ
チドが、以下に表される配列からなるオリゴヌクレオチドの群より少な
くとも1以上選択され、プライマー機能を有するオリゴヌクレオチド；
- 5 1)配列番号2から27のいずれかで表される塩基配列からなるオリゴ
ヌクレオチド。
- 2)前記1)に記載のオリゴヌクレオチドの相補鎖。
- 3)前記1)または2)に記載のオリゴヌクレオチドとストリンジェント
- 10 な条件下でハイブリダイズしうるオリゴヌクレオチド。
- 4)前記1)～3)のいずれか1に記載のオリゴヌクレオチドと約60%の
相同性を有するオリゴヌクレオチド。
- 5)前記1)～4)に記載のオリゴヌクレオチドのうち、1ないし数個の塩
基が置換、欠失、挿入もしくは付加といった変異された塩基配列を含む
- 15 オリゴヌクレオチド。

- 1 2. 請求の範囲第11項に記載のオリゴヌクレオチドから選択され
る少なくとも1のオリゴヌクレオチドを用いて核酸増幅処理方法を行う
ことを含む請求の範囲第1項～第9項のいずれか1に記載の検査方法。
- 20

- 1 3. 請求の範囲第1項～第10項または第12項のいずれか1に記
載の検査方法に使用する試薬を含んでなる検査用試薬または検査用試薬
キット。

第1図



1/15

SEQUENCE LISTING

<110> Sysmex Corporation

<120> A check up method for Glaucoma

<130> GP03-1001

<150> JP P2002-093443

<151> 2002-03-29

<160> 27

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 6000

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gctccacagg aagtctcccc actctagact tctgcatcac gatgttacag ccagaagctc 60

cgtgagggtg aggggtctgtg tcttacacct acctgtatgc tctacacctg agctcactgc 120

aacctctgcc tcccagggtc aagcaattct cctgtctcag cctcccgcgt agctgggact 180

acaggcgcac gcccggttaa tttttgtatt gttagtagag atgggggttc accatattag 240

cccggttgtt cttgaactcc tgacctcagg tgatccaccc acctcagcct cctaaagtgc 300

tgggattaca ggcatgagtc accgcgcccc gccaaagggtc agtgtttaat aaggaataac 360

ttgaatggtt tactaaacca acagggaaac agacaaaagc tgtgataatt tcagggattc 420

ttgggatggg gaatgggtgc atgagctgcc tgctagtcc cagaccactg gtctcatca 480

2/15

ctttcttccc tcattctcat tttcaggcta agttaccatt ttattcacca tgcttttgtg 540

gtaagcctcc acatcggtac tgaaataaga gtatacataa actagttcca ttggggcca 600

tctgtgtgtg tgtatagggg aggagggcat accccagaga ctcttgaag ccccggcag 660

aggtttcttc tccagctggg ggagccctgc aagcaccggg ggtcctgggt gtctgagca 720

acctgccagc cctgccact ggtgttttg ttactctct ctaggacct gttgcttct 780

atttctgtgt gactcgttca ttcatccagg cattcattga caatttattg agtactata 840

tctgccagac accagagaca aaatgggtgag caaagcagtc actgcctac ctctgtggag 900

gtgacagttt ctcatggaag acgtgcagaa gaaaattaat agccagccaa cttaaacca 960

gtgctgaaag aaaggaaata aacaccatct tgaagaattg gctttaaaca 1020

ggccacctcc ctagcgcctc ctgctgcctc catcgtgccc gcttccagct 1080

cttccaagcc tctctctcca tcagtcacag cgctgcagct ggctgcctc gtttccctg 1140

aatcgtctg gtgcatctga gctggagact ccttggtcc aggtccaga aaggaaatgg 1200

agagggaac tagtctaacg gagaatctgg aggggacagt gtttctcag agggaaagg 1260

gcctccagct ccaggagaat tccaggaggt ggggactgca gggagtgggg acgtggggc 1320

tgagcgggtg ctgaaaggca ggaagtgaa aagggaagg ctgaagctgc ccagatgtt 1380

agtggttgc acggggctgg gagtttccg ttgcttctg tgagccttt tatctttct 1440

ctgcttgag gagaagaagt ctattcatg aagggatgca gttcataaa gtcagctgtt 1500

aaaattccag ggtgtgatg ggttttctt cacgaaggcc ttatttaat gggaatatag 1560

gaagcgagct catttctag gccgttaatt cacgaagaa gtgactggag tcttttctt 1620

catgtcttct gggcaactac tcagccctgt ggtggacttg gcttatgcaa gacggtcgaa 1680

aaccttgga aacaggagact cggttttctt tctggttctg ccattggttg gctgtgcgac 1740

cgtgggcaag tgtctctctt tccctgggcc atagtcttct ctgctataaa gacccttgca 1800

gctctcgtgt tctgtgaaca cttccctgtg attctctgtg aggggggatg ttgagagggg 1860

aaggaggcag agctggagca gctgagccac aggggaggtg gagggggaca ggaaggcagg 1920

cagaagctgg gtgctccatc agtctcact gatcacgtca gactccagga ccgagagcca 1980

caatgcttca ggaaagctca atgaacccaa cagccacatt ttccttcctt aagcatagac 2040

aatggcattt gccaaataacc aaaaagaatg cagagactaa ctggtggtag cttttgcctg 2100

gcattcaaaa actgggggag aacagagca aaatgccaga gattgttaaa cttttcacc 2160

tgaccagcac ccacgcagc tcagcagtga ctgctgacag cacggagtga cctgcagcgc 2220

aggggaggag aagaaaaaga gagggatagt gtatgagcaa gaaagacaga ttcattcaag 2280

ggcagtggga attgaccaca gggattatag tccacgtgat cctgggttct aggaggcagg 2340

gctatattgt ggggggaaaa aatcagttca agggaagtcg ggagacctga tttctaatac 2400

tatatatttc ctttacaagc tgagtaattc tgagcaagtc acaaggtagt aactgaggct 2460

gtaagattac ttagtttctc cttattagga actcttttc tctgtggagt tagcagcaca 2520

agggcaatcc cgtttctttt aacaggaaga aaacattcct aagagtaaag ccaaacagat 2580

tcaagcctag gtcttgctga ctatatgatt gggtttttga aaaatcattt cagcgatgtt 2640

tactatctga ttcagaaaat gagactagta ccctttggtc agctgtaaac aaacacccat 2700

ttgtaaatgt ctcaagttca ggcttaactg cagaaccaat caaataagaa tagaatcttt 2760
agagcaaact gtgtttctcc actctggagg tgagtctgcc agggcagttt ggaaatattt 2820
acttcacaag tattgacact gttgttggtta ttaacaacat aaagttgctc aaaggcaatc 2880
attatttcaa gtggcttaaa gttacttctg acagttttgg tatatttatt ggctattgcc 2940
atttgctttt tgttttttct ctttgggttt attaatgtaa agcagggatt attaacctac 3000
agtcagaaaa gcctgtgaat ttgaatgagg aaaaaattac atttttgttt ttaccacctt 3060
ctaactaaat ttaacatttt attccattgc gaatagagcc ataaactcaa agtggttaata 3120
acagtacctg tgattttgtc attaccaata gaaatcacag acattttata ctatattaca 3180
agtgttcag atacgttgta agtgaaatat ttatactcaa aactactttg aaattagacc 3240
actgtctgga tctgtttttt aacatattaa taaaacatgt taaaattttt gatattttga 3300
taatcatatt tcattatcat ttgtttcctt tgtaatctat attttatata ttgaaaaca 3360
tctttctgag aagagttccc cagatttcac caatgaggtt cttggcatgc acacacacag 3420
agtaagaact gatttagagg ctaacattga cattgggtgc tgagatgcaa gactgaaatt 3480
agaaagttct cccaaagata cacagttgtt ttaaagctag gggtaggggg ggaaatctgc 3540
cgcttctata ggaatgctct ccttgagacc tggtaggggtg ctgtccttgt gttctggctg 3600
gtgtttattt ttctctgtcc ctgtacgtc ttaaaggact tgtttgatc tccagttcct 3660
agcatagtgc ctggcacagt gcaggttctc aatgagtttg cagagtgaat ggaaatataa 3720
actagaaata tacccttggt gaaatcagca caccagtagt cctgggtgtaa gtgtgtgtac 3780
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtaaaa ccaggtggag atataggaac tattattggg 3840

gtatgggtgc ataaattggg atgttctttt taaaaagaaa ctccaaacag acttctggaa 3900

ggttattttc taagaatctt gctggcagcg tgaaggcaac cccctgtgc acagccccac 3960

ccagcctcac gtggccacct ctgtcttccc ccatgaaggg ctggctcccc agtatatata 4020

aacctctctg gagctcgggc atgagccagc aaggccaccc atccaggcac ctctcagcac 4080

agcagagctt tccagaggaa gcctcacaa gcctctgcaa tgaggttctt ctgtgcacgt 4140

tgctgcagct ttgggcctga gatgccagct gtccagctgc tgcttctggc ctgcctggtg 4200

tgggatgtgg gggccaggac agctcagctc aggaaggcca atgaccagag tggccgatgc 4260

cagtatacct tcagtgtggc cagtcccaat gaatccagct gccagagca gagccaggcc 4320

atgtcagtca tccataactt acagagagac agcagcacc aacgcttaga cctggaggcc 4380

accaaagctc gactcagctc cctggagagc ctctccacc aattgacctt ggaccagget 4440

gccaggcccc aggagacca ggaggggctg cagagggagc tgggcaccct gaggcgggag 4500

cgggaccagc tggaaacca aaccagagag ttggagactg cctacagcaa cctctccga 4560

gacaagtcag ttctggagga agagaagaag cgactaaggc aagaaaatga gaatctggcc 4620

aggaggttgg aaagcagcag ccaggaggta gcaaggctga gaaggggcca gtgtccccag 4680

acccgagaca ctgctcgggc tgtgccacca ggctccagag aaggtaagaa tgcagagtgg 4740

ggggactctg agttcagcag gtgatatggc tcgtagtac ctgctacagg cgctccaggc 4800

ctccctgcct gccctttctc ctagagactg cacagctagc acaagacaga tgaattaagg 4860

aaagcacagc gatcaccttc aagtattact agtaatttag ctctgagag cttcatttag 4920

6/15

attagtgggt cagagttctt gtgcccctcc atgtcagttt tcacagtcca tagcaaaagg 4980

agaaataaaa ggaccgggtg agatgtgtct gcatatgagc agtagaaagt tgtcaattgt 5040

cccttttgaa aaactatcct ttttgaacc ttgtctcaga ttgtatttg tacctttga 5100

tgtaaataatg acctttattt atgaaattac aatagatttg ggaaatgata ataagtggta 5160

agtttttggt ttttttaaa tgttcttccc tggcaaaata aagagatggc acctctctgt 5220

cagtttctt aatatgttgt tctgaaagt ttcttactca gtccaatctg agaacctctg 5280

ctttaagtc atcagacaaa ttcttgagat ggcttttct gagaggtct tctgttcac 5340

ctggtccctt cttgctaaa ggtgagtcgt tgtgtgtgtg ggggggtgc gggggtgagg 5400

tgttgggga ggtcttcta ttagctggga agatgggtatt tgtgtcaatctg 5460

tgggtccca aatattcct gttgaggaag tgttctaac atgaggga 5520

atccagttgt tggacaatta gtttgactg gtcaaagatg tcagtccaa ggaagaaaga 5580

aaaaaggggt ggggaagggc ttgttctata ttaaagagac taaagaaatg tgtaaccaa 5640

atgtagtga tgagtctga ttggtgtct catccaagg ggaaaaaggc tatgaggaac 5700

aggtttggga taactgaggc aatttgactg ctcatatta tgttactgta ttaatgtca 5760

gtttcttggg gagataatga tactgtggtt gcgaaggata aaatcttgt tctatggaga 5820

tacatgctta agtaccagg gtgaggcgtc aggatgtctg caattgctc tcaaatggtt 5880

gaagaaagac tgcaaatata tagataatga gagaagaaa ggtaaaaca ctgtggcaa 5940

atattaataa ctggtgaatt acaaactggt gaatctaagt atatggggag cttattgtac 6000

7/15

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 2

ctctagactt ctgcatcacg atgtt

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 3

agctcccat atacttagat tcacc

25

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 4

actaaaccaa cagggaaac

19

<210> 5

8/15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 5

tggttggttt gttatcactc

20

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 6

ctctccatc agtcacag

18

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Deisigned DNA based on MYOC gene

<400> 7

gaagtctatt tcatgaaggg

20

<210> 8

<211> 18

9/15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 8

agctctcgtg ttctgtga

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 9

aaacttttca ccctgacc

18

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 10

ttctctgtgg agttagcag

19

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

10/15

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 11

acataaagtt gctcaaagg

19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 12

ctttgaaatt agacctctg

20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 13

gctgttattt ttctctgtcc

20

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

11/15

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 14

ctaagaatct tgctggca

18

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 15

ttcttacctt ctctggagc

19

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 16

ttatggatga ctgacatgg

19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

12/15

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 17

tttatatata ctggggagcc

20

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 18

ccatcccaaa ggaact

18

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 19

ggaactcttc tcagaaagat

20

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

13/15

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 20

aaaagcaaat ggcaatag

18

<210> 21

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 21

gacctaggct tgaatctgt

19

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 22

tgctcatata ctatccctc

19

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Desigend DNA based on MYOC gene

14/15

<400> 23

agtgaggact gatggagc

18

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 24

attcccata aataaaggc

19

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 25

agtctccagc tcagatgc

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

15/15

<400> 26

attgtcaatg aatgcctg

18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Designed DNA based on MYOC gene

<400> 27

cagtggctcg ggactagg

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/566

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/566

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPIDS, MEDLINE, BIOSIS, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/42220 A (The Regents of The University of California), 20 July, 2000 (20.07.00), & AU 2000024497 A & EP 1141386 A & JP 2000-424497 A & KR 2002068259 A	1-13
Y	Connolly, J. et al., Br.J. Ophthalmol., Vol.86, page 195, (2002 February)	1-13
Y	MABUCHI, F. et al., Clin.Genet., Vol.59, pages 263 to 268, (2001)	1-13
Y	KUBOTA, R. et al., Human Mutation, Vol.16(3), page 270, (2000)	1-13
Y	SHIMIZU, S. et al., Am.J.Ophthalmol., Vol.130(2), pages 165 to 177, (2000)	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 May, 2003 (09.05.03)	Date of mailing of the international search report 27 May, 2003 (27.05.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03307

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Fingert J.H. et al., Human Mol.Genet., Vol.8(5), pages 899 to 905, (1999)	1-13
Y	Allingham R.R. et al., Invest.Ophthalmol.Vis.Sci., Vol.139, pages 2288 to 2295, (1998)	1-13
Y	Rozsa F.W. et al., Molecular Vision, Vol.4, page 20, (1998)	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N 15/09, C12Q 1/68, G01N 33/53,
G01N 33/566

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N 15/09, C12Q 1/68, G01N 33/53,
G01N 33/566

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPIDS, MEDLINE, BIOSIS
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 00/42220 A(The Regents of The University of California) 2000.07.20 & AU 200002657 A & EP 1141386 A & JP 2000-534135 A & KR 2002068259 A	1-13
Y	Cobb C. J. et al., Br. J. Ophthalmol., vol. 86, pp. 191-195 (2002) Feb.)	1-13
Y	Mabuchi F. et al., Clin. Genet., vol. 59, pp. 263-268 (2001)	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.05.03

国際調査報告の発送日

27.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長 井 啓 子



4N 9123

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 引用文献の カテゴリー*	関連すると認められる文献 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Kubota R. et al., Human Mutation, vol. 16(3), p. 270 (2000)	1-13
Y	Shimizu S. et al., Am. J. Ophthalmol., vol. 130(2), pp. 165-177 (2000)	1-13
Y	Fingert J.H. et al., Human Mol. Genet., vol. 8(5), pp. 899-905 (1999)	1-13
Y	Allingham R.R. et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., vol. 39, p. 2288-2295 (1998)	1-13
Y	Rozsa F.W. et al., Molecular Vision, vol. 4, p. 20 (1998)	1-13